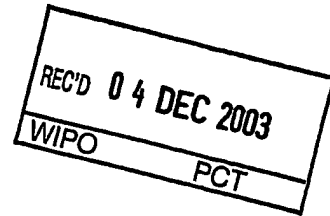


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 48 751.0

Anmeldetag:

18. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. med. Wolfgang E. Berdel,
 Dr. med. Carsten Müller-Tidow,
 Priv.-Doz. Dr. med. Hubert Serve und
 Björn Steffen, Münster, Westf/DE.

Bezeichnung:

Dyslokalisationsmoleküle und deren Verwendung

IPC:

C 07 K 14/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Heidet

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Dr.med. Prof. Wolfgang E. Berdel
Brüggefeldweg 11
48161 Münster

Dr. med. Carsten Müller-Tidow
Lortzingstr. 9
48145 Münster

PD Dr. med. Hubert Serve
Ochtrupweg 42
48161 Münster

Björn Steffen
Bentelerstr. 39
48149 Münster

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT von HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DR. MARTIN WÉBER-QUITZAU
DR. BERND JANSSEN
DR. ALBRECHT von MENGES
DR. MARTIN NOHLEN
MÜNCHEN
DIPL.-ING. LARS MANKE
RECHTSANWALT IN HAMBURG
DR. FRANK DETTMANN

Oktober 2002
me/gu/P 57744

Dyslokalisationsmoleküle und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dyslokalisationsmoleküle, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Tumoren.

Die Lokalisation eines Proteins, also der Aufenthaltsort in einer Zelle, in einem Gewebe oder im Plasma hat wesentlichen Einfluss auf die Funktion und Aktivität des Proteins. Dies gilt in besonderem Maße für Proteine, die an der Zellregulation beteiligt sind.

Eukaryonten-Zellen enthalten intrazelluläre Membranen, die nahezu die Hälfte des Zellinhaltes in räumlich getrennte, als Organellen bezeichnete Kompartimente aufteilen. Die Haupttypen der in allen eukaryontischen Zellen vorkommenden membranumschlossenen Organellen sind das Endoplasmatische Reticulum, der Golgi-Apparat, der Zellkern, die Mitochondrien, die Lysosomen, die Endosomen und die Peroxisomen. Jedes Organell besitzt einen bestimmten Satz an Proteinen, der die Aufrechterhaltung der organellspezifischen Funktionen gewährleistet.

Die neusynthetisierten Proteine finden ihren Weg vom Cytosol, wo sie gebildet werden, zu dem Organell, in dem sie spezifische Aufgaben erfüllen, indem sie einem spezifischen Transportweg folgen. Der Transportweg ist durch Signale in Form von Signalpeptiden oder Signalbereichen in der Aminosäure-Sequenz des Proteins festgelegt. Diese Signalpeptide werden von entsprechenden Rezeptoren des Zielorganells erkannt. Proteine, die ihre Aufgabe im Cytosol erfüllen, enthalten keine Signalpeptide und verbleiben daher im Cytosol (Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle; VCH Verlag, 3. Auflage).

Die zielgerichtete Lokalisation der Proteine wird ferner durch deren Organisation als multimere Komplexe erzielt, welche gezielt zu subzellulären Strukturen transportiert werden können. Diese Komplexe werden an entsprechenden Orten durch ihre Affinität gegenüber Anker- oder Scaffold-Proteinen und mittels anderer struktureller Komponenten an diesem Ort gehalten. Die Affinität einzelner Proteine zu diesen Strukturen hängt von entsprechenden Lokalisationsdomänen, post-translationalen Modifikationen, allosterischen Veränderungen und anderen Effekten ab (Stein et al., J.Cell.Biochem., Suppl.(2000), S.84-92).

Die Funktion verschiedener Proteinfamilien, die DNA-bindende und transaktivierende Aktivität aufweisen, wie beispielsweise Catenin, Notch oder STAT-Proteine, hängt essentiell von dem Transport aus dem Cytosol in den Zellkern ab.

In vielen Erkrankungen ergeben sich funktionale Konsequenzen einer Mutation durch veränderte Lokalisation der mutierten Genprodukte. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) beispielsweise hängt das transformierende Potential des Bcr-Abl nicht nur von der aktivierten Kinaseaktivität des Abl ab, sondern auch von der gestörten, Aktin-gebundenen Lokalisation des Proteins. Aufgrund dieser Lokalisation werden sowohl mitogene als auch antiapoptotische Signalwege aktiviert, wodurch die transformierende Aktivität erreicht

wird (Daley et al., Science, Vol.247 (1990), S.824-830).

Ein nukleärer Einschluß des Bcr-Abl durch unspezifische Hemmung der nukleären Exportmaschinerie führt beispielsweise zur Apoptose der Bcr-Abl positiven Zellen (Vigneri P. & Wang J.Y., Nat.med., Vol.7 (2001), S.228-234).

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) ist die maligne Transformation oft mit einer Proteindyslokalisierung verbunden. Die häufigsten chromosomalen Translokationen erzeugen chimäre Proteine, die Transkriptionsfaktoren umfassen, wodurch häufig die DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators mit einem Transkriptionsrepressor fusioniert wird. Es erfolgt somit ein Fehltransport des Transkriptionsrepressors zu den Zielgenen des Transkriptionsaktivators.

Die häufigste chromosomale Translokation bei der AML ist die t(8;21) Translokation, die in 10-15% der erwachsenen Patienten mit dieser Krankheit gefunden wird (Downing J.R., Br.J. Haematol. Vol. 106 (1999), S.296-308). Aufgrund dieser Translokation wird das C-terminale Ende des Transkriptionsaktivators AML1 durch den Transkriptionsrepressor ETO ersetzt und erzeugt das Fusionsprotein AML1-ETO (Meyers et al., Mol.Cell.Biol., Vol.15 (1995), S.1974-1982; und Lenny et al., Oncogene, Vol.11 (1995), 1761-1769).

Das Fusionsprotein AML1-ETO ist in der Lage, die Bindung verschiedener Co-Repressoren und Histon-Deacetylasen (HDACs) zu bewirken, und auf diese Weise die Expression der AML1 Zielgene, beispielsweise von GM-CSF, der neutrophilen Elastase und c/EBP α , zu inhibieren (Britos-Bray, M. & Friedman, A.D., Mol.Cell.Biol., Vol.17 (1997), S.5127-5135); Frank et al., Oncogene, Vol.11 (1995), S.2667-2674; Pabst, et al., Nat.Med., Vol.7 (2001), S.444-451; und Oelgeschlager et al., Mol.Cell.Biol., Vol.16 (1996), S.4717-25). Es ist davon auszugehen, daß diese Wirkung des AML1-ETO für die für AML typische Blockade der Differenzierung verantwortlich ist.

Hämatologische Tumorerkrankungen, wie beispielsweise AML, werden heute üblicherweise durch die Applikation von Chemotherapeutika behandelt. Die beschränkte Verfügbarkeit von Wirkstoffen, die spezifisch auf Krebszellen gerichtet sind und diese angreifen, ist ein wesentlicher Grund für die schlechte Prognose bei vielen Krebsarten.

Für den Patienten ist die Therapie in jedem Fall mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden, da die Wirkung des jeweiligen Therapieansatzes alle proliferierenden Zellen trifft. Die Nebenwirkungen können bis hin zu akuten Nierenversagen und toxisch bedingten Organschädigungen an Herz, Lunge, Leber und Nervensystem führen. Als Folge der immunsuppressiven Wirkung dieser Therapie muß mit einer gehäuften Anzahl von tödlich verlaufenden Infektionen gerechnet werden.

Im Stand der Technik wurde daher versucht, Tumorzell-spezifische Therapieansätze zu entwickeln. So wurde ein defizientes Adenovirus konstruiert, das ausschließlich in Tumoren mit Mutationen im p53 Signaltransduktionsweg replizieren kann (Bischoff et al., 1996, Science, Vol.274, S.373-6). Durch dieses Vorgehen werden Tumorzellen, welche eine p53 Mutation aufweisen, infiziert, während andere Zellen nicht beeinflusst werden. Der praktische Wert dieser Therapie wird gegenwärtig in klinischen Versuchen untersucht (McCormick F., 2000, Semin.Cancer Biol., Vol.10, S.453-9).

Die meisten Therapieansätze sind jedoch auf die Identifizierung kleiner Moleküle gerichtet, die als Inhibitoren onkogener Proteine verwendet werden könnten, beispielsweise spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinasen. STI571, ein Inhibitor verschiedener Tyrosinkinasen, darunter Bcr-Abl, hat sich gegen t(9;22) Leukämien als wirksam erwiesen (Vigneri et al., 2001, Nat.Med., Vol.7, S.228-34). Trotz der Wirksamkeit des STI571 bei der Hemmung der molekularen Ziele in BCR-ABL-assoziierten Erkrankungen wird volle Wirksamkeit nur bei CML-Patienten mit einer frühen (chronischen Phase), aber

nicht voll ausgebildeten Erkrankung erreicht. Im Gegensatz dazu ist ein Rückfall bei den meisten Patienten mit Bcr-Abl positiver Akuter Lymphoblastischer Leukämie und CML-Blastenkrise zu beobachten. Der Grund besteht wahrscheinlich darin, daß der Krebs das Ergebnis einer Serie genetischer Veränderungen ist und die Umkehr eines dieser onkogenen Ereignisse durch einen Wirkstoff für die Heilung der Erkrankung nicht ausreichend ist.

Obwohl molekulare Angriffsziele (sogenannte "targets") für eine Krebstherapie mit zunehmender Geschwindigkeit identifiziert werden, sind bislang kaum Ideen entwickelt worden, wie dieses Wissen für spezifische Therapien genutzt werden könnte.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die als aktiver Wirkstoff eines Arzneimittels eine verbesserte Behandlung von Tumoren, insbesondere von Leukämien ermöglichen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verbindungen gelöst, die Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweisen und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken können.

Im Gegensatz zu den Therapieansätzen aus dem Stand der Technik richtet sich der Therapieansatz der vorliegenden Erfindung somit auf eine Dyslokalisation eines onkogenen Moleküls, bei dem die Funktion des Onkogens nicht inhibiert, sondern zur Eliminierung der Onkogen-enthaltenden Zellen genutzt wird. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind hoch spezifisch und haben keinerlei Wirkung auf Zellen, die das Tumor-spezifische Molekül nicht aufweisen.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Verbindung um ein Peptid, Oligopeptid, Protein oder Fusionsprotein. Es ist aber ebenfalls möglich, kleine Moleküle einzusetzen, die durch ihre spezifische Bindung an das Tumor-

spezifische Molekül charakterisiert sind. Eine Vielzahl organischer Moleküle ist hierbei einsetzbar. Als organische Moleküle werden vorliegend Kohlenwasserstoffe von geringem Molekulargewicht verstanden. Diese können ein Molekulargewicht von <5000 Da, vorzugsweise <1000 Da und besonders bevorzugt <500 Da aufweisen. Ebenso ist es denkbar, zusammengefügte Moleküle zu verwenden, die aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen.

Das Tumor-spezifische Molekül ist ein Molekül, das in dieser Form entweder ausschließlich in Tumorzellen vorliegt oder in Tumorzellen in einer anderen Konzentration als in gesunden Zellen vorliegt. Vorzugsweise handelt es sich auch bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA. Hierbei sind auch tumorspezifische posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung und ähnliche Modifikationen als Tumor-spezifische Parameter möglich.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Fusionsprotein, welches ausschließlich in Tumorzellen vorliegt, beispielsweise das Molekül AML1-ETO. Weiter angreifbare Tumor-spezifische Moleküle sind die aus anderen chromosomalen Translokationen entstehenden Fusionsproteine bei Leukämien (Bcr-Abl, PML-RARalpha, PLZF-RARalpha, MLL-Fusionsproteine, etc.) sowie bei anderen malignen Erkrankungen (z.b. EWS-Fli bei Sarkomen).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen eine Bindungsaffinität für die Tumor-spezifischen Moleküle auf. Die Bindungsaffinität liegt vorzugsweise im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-12} , und besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-9} .

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, eine Dyslokalisierung der Tumor-spezifischen Moleküle zu bewirken. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Dyslokalisierung eines

Tumor-spezifischen Moleküls der Transport des Moleküls innerhalb der Zelle oder des Gewebes an einen Ort verstanden, an dem dieses Molekül in Tumorzellen üblicherweise nicht vorliegt. Beispielsweise kann eine Dyslokalisierung eine Bindung Tumor-spezifischer Proteine (beispielsweise Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren) an die genomische DNA an Positionen bewirken, an denen die Tumor-spezifischen Proteine sonst nicht binden würden.

Gemäß eines anderen Beispiels kann die Dyslokalisierung eines Tumor-spezifischen Moleküls zur Folge haben, daß dieses sezerniert oder in ein Zellorganell transportiert wird, obwohl es in der Tumorzelle ein cytoplasmatisches Molekül ist. Das Tumor-spezifische Molekül kann beispielsweise aus dem Nukleus exportiert werden, obwohl es in Tumorzellen ein nukleäres Molekül ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung führt die Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls zu einer mehr als 60%igen Inhibierung des Wachstums der Tumorzellen, wobei eine mehr als 80%ige Inhibierung besonders bevorzugt ist. Die Wachstumsinhibition kann über eine Verringerung der Kolonien-Bildung in Methylzellulose nach dem Verfahren von Mizuki, M. et al. "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways", Blood, 2000 Dec 1, Vol. 96(12), 3907-14, bestimmt werden.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform führt die Dyslokalisierung zu einer Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Die Apoptose in den Tumorzellen ist dabei in Zellen, welche mit dem erfindungsgemäßen Molekül behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen vorzugsweise um den Faktor 2 erhöht, wobei eine Steigerung der Apoptose um mindestens den Faktor 3 besonders bevorzugt ist. Die gesteigerte Induktion der Apoptose in den Tumorzellen kann mittels Standardassays gemessen werden (Darzynkiewicz, Z. et al., "Flow cytometry in analysis of cell

cycle and apoptosis", Semin Hematol. 2001 Apr, Vol.38(2), 179-93).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls beispielsweise zur Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls an eine Nukleinsäuresequenz führen, welche die Transkription eines Gens reguliert. Durch die Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls kann die Transkription des Gens aktiviert oder inhibiert werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne und/oder die Peptidsequenz der AML1-Bindungsdomäne des MEF ("myeloid elf like factor"). Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Verbindung die in SEQ ID NO:1 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für ein erfindungsgemäßes Peptid oder Protein kodieren, das Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann. Bei der Nukleinsäure handelt es sich vorzugsweise um DNA oder RNA. Die Nukleinsäure kann Teil eines Vektors sein, der für eine Expression der Nukleinsäure ausgelegt sein kann. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Verbindung von der in SEQ ID NO:2 gezeigten Nukleotidsequenz kodiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirts-Zellen, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufweisen.

Die Erfindung umfaßt ferner Arzneimittel, welche eine erfindungsgemäße Verbindung, Nukleinsäure oder Wirts-Zellen umfassen. Das Arzneimittel kann ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen und zur oralen, intravenösen oder intramuskulären

Verabreichung formuliert sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung, Nukleinsäuren oder Wirts-Zellen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren, Leukämien, insbesondere der Akuten Myeloischen Leukämie. Die Behandlung einer Akuten Myeloischen Leukämie, die durch eine t(8;21) Translokation verursacht wurde, ist besonders bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind ferner Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen umfaßt. Soweit es sich dabei um ein Peptid oder Protein handelt, kann dieses rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewonnen werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei denen man:

- (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert; und
- (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.

Tumorspezifische Moleküle werden bei diesem Verfahren mittels moderner Genomik- und Proteomik-Verfahren identifiziert. Hierbei können zum Beispiel Microarray-Analysen oder 2D-Proteingelelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung sowie eine Kombination dieser Verfahren eingesetzt werden.

Alle im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Analyse von Unterschieden zwischen Tumorzellen und nicht-entarteten Zellen können erfindungsgemäß zur Identifizierung Tumor-spezifischer

Moleküle verwandt werden.

In einem zweiten Schritt wird das Zielmolekül identifiziert, das zur Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls benutzt werden kann. Hierbei kann es sich wiederum um ein Protein, eine RNA oder ein DNA-Fragment handeln.

Das Screening-Verfahren wird vorzugsweise als Hochdurchsatzverfahren so angewandt, daß mittels automatischer Pipettierroboter tausende von Substanzen auf ihre Bindung an das Tumor-spezifische Molekül und an das Dyslokalisationsmolekül getestet werden. Ausgewählt werden dann Verbindungen, die jeweils mit hoher Affinität und Spezifität an eines der beiden Moleküle oder an beide zugleich binden. Werden zwei unterschiedliche Moleküle identifiziert (wobei eines an das Tumor-spezifische Molekül bindet und das andere die Dyslokalisation auslöst), so werden diese Moleküle durch chemische Verfahren, z.B. durch das Einführen eines Polylinkers gekoppelt. Ein großer Vorteil dieses Screeningverfahrens liegt darin, daß jedes Molekül nur an das Zielmolekül binden muß, aber nicht notwendigerweise auch die Funktion des Zielmoleküls beeinflussen muß.

In den nachfolgenden Beispielen wurde ein rekombinantes Fusionsprotein erzeugt, um die AML1-ETO-Repressoraktivität auf Promotoren zu richten, die für das Überleben und die Proliferation myeloischer Zellen essentiell sind. Ein hohes Maß an Spezifität wurde durch verschiedene Effekte erreicht. Die c-myb Bindungsstellen wurden als Ziel für GFP-M&M und AML1-ETO Repressorkomplexe genutzt. C-myb ist für hämatopoetische Zellen essentiell, jedoch nicht für die Entwicklung anderer Organe (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89).

Die essentielle Bedeutung des c-myb für Zellproliferationen leukämischer Zellen ist allgemein bekannt. Die Hemmung myb-abhängiger Gene stellt ein wesentliches Ziel der Leukämietherapie

dar (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89; Ratajczak, 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.118237; Gewirtz et al., 1988, Science, Vol.242, S.1303-6; Gewirtz A.M., 1999, Oncogene, Vol.18, 3056-62).

Die Experimente zeigen, daß das erfindungsgemäße Dyslokalisationsmolekül (hier ein rekombinantes Fusionsprotein) gegenüber Zellen, welche AML1-ETO nicht exprimieren, nicht toxisch ist. Eine hohe spezifische Toxizität wurde für Zellen erzielt, die tumorinduzierende Transformationen erlitten hatten.

Beschreibung der Figuren

- Figur 1: Konstruktion eines AML1-ETO Dyslokalisationsproteins
- a Hypothese der Funktion eines chimären Proteins bestehend aus der DNA Bindungsdomäne von c-myb und der AML1 Bindungsdomäne von MEF.
 - b Struktur des chimären Proteins und der Deletionismutante.
 - c Immunoblot-Nachweis aus Cos7-Zell-Lysaten mit einem Anti-GFP-Antikörper nach Transfektion der Zellen mit GFP, GFP-AM&M und GFP-M&M.

Figur 2: Spezifische Bindung des GFP-M&M an myb Bindungsstellen und Bindung von AML1-ETO in vitro. Zellkernextrakte von Cos7-Zellen, die mit c-myb GFP-M&M und AML1-ETO transfiziert worden waren, wurden in "Elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assays" (EMSA) analysiert. Kompetitions-Experimente mit spezifischen myb und unspezifischen Oligonukleotiden zeigen die Spezifität der GFP-M&M Bindung. Der Supershift von M&M, der durch die

Kotransfektion von GFP-M&M mit AML1-ETO entsteht, zeigt die Dyslokalisierung von AML1-ETO zu den myb Bindungsstellen.

Figur 3:

Bindung des AML1-ETO an den endogenen c-kit Promotor mittels GFP-M&M. KCL22 Zellen wurden mit FLAG-AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert, DNA-bindende Proteine wurden mit Hilfe von Formaldehyd fest an DNA gekoppelt, die Zellen lysiert, die DNA fragmentiert und mit anti-FLAG oder unspezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Im immunpräzipitierten Chromatin wurden die Promotor-Sequenzen von c-kit und $pl4^{ARF}$ mit einer PCR detektiert. Ein repräsentatives von zwei Experimenten wird gezeigt.

Figur 4:

Spezifische Repression des myb-abhängigen Promotors durch GFP-M&M in Anwesenheit von AML1-ETO. KCL22-Zellen wurden transient mit einem myb abhängigen Luciferase-Konstrukt und c-myc, AML1, AML1-ETO, GFP-AML1 und GFP-M&M (wie angezeigt) transfiziert. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 5:

GFP-M&M reprimiert Koloniewachstum in AML1-ETO exprimierenden Zellen.

- a 32D Zellen wurden mit GFP als Kontrolle oder AML1-ETO und GFP-M&M wie angegeben transfiziert und 1×10^5 Zellen in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Die Photos zeigen repräsentative Kolonien an Tag 10.
- b 32D Zellen wurden wie angegeben transfiziert und im Kolonie-Nachweisverfahren ausgesiedelt. An Tag 10 wurden die Kolonien gezählt. Hier ist die

Repression des Koloniewachstums verglichen mit der Kontrolltransfektion mit GFP (als 1 gesetzt) dargestellt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt.

- c AML1-ETO wurde alleine oder in Kombination mit GFP-M&M oder GFP-AM&M in 32D-Zellen transfiziert und anschließend für Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.
- d GFP oder GFP-M&M wurden in Kasumi-1-Zellen transfiziert, die natürlicherweise AML1-ETO exprimieren und in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 6:

GFP-M&M induziert in AML1-ETO exprimierenden Zellen Apoptose. 32D Zellen wurden mit AML1-ETO, GFP-M&M oder beiden Vektoren transfiziert und anschließend wurden die transfizierten Zellen durch Durchflußzytometrie sortiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in einem TUNEL-Nachweisverfahren analysiert.

- a Darstellung der FACS Ergebnisse für BrdU-positive, apoptotische Zellen. Die offenen Kurven stellen die Apoptoserate in Zellen, die zu Kontrollzwecken mit einem Leervektor transfiziert wurden, dar.
- b Dargestellung der Anteile von apoptotischen Zellen in den transfizierten 32D Zellen.

Materialien und Methoden

In den Beispielen wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

1. Plasmide:

Das GFP-M&M Expressionsplasmid in pcDNA3.1 wurde mittels PFU-Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines murinen c-myb Expressionsplasmides und von cDNA aus KCL22 Zellen als Template hergestellt, wobei spezifische Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb (kodiert von den Nukleotiden 193-594 der SEQ ID NO:13; umfassend die Restriktionsschnittstellen für KpnI und BamHI) und die AML1 Bindungsdomäne von MEF (kodiert von den Nukleotiden 251-618 der SEQ ID:12; umfassend Restriktionsschnittstellen für BamHI und EcoRI) verwendet wurden. Die PCR Produkte wurden in Leserichtung in GFP-pcDNA3.1 (GFP entspricht den Nukleotiden 91-813 von SEQ ID NO:11) kloniert. GFPAM&M wurde entsprechend kloniert, wobei ein PCR Fragment verwendet wurde, welchem die ersten 159 Basenpaare der DNA-Bindungsdomäne des c-Myb fehlten.

Primer für die AML1 Bindungsdomäne von MEF:

MEF-BamHI for: 5'- ATA GGA TCC GCC ACC TCG CAC ACC ATG TCA-3' (SEQ ID NO: 3)

MEF-EcoRI rev: 5'- CAG AAT TCG CCT TTG CCA TCC TTT GAT TTC-3' (SEQ ID NO: 4)

Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb:

myb-KpnI for: 5'- CAG AGA GGT ACC GTC ATT GCC AAT TAT CTG-3' (SEQ ID NO: 5)

myb-BamHI rev: 5'- CAG AGA GGA TCC GTA GCC TTC CTG TTC CAC-3' (SEQ ID NO: 6)

Das myb-TK (Thymidinkinase) Luziferasekonstrukt war ein Geschenk von Prof. Dr. Klempnauer. Die AML1-ETO cDNA wurde in pcDNA3.1 subkloniert.

2. Zelllinien und Transfektion:

Die IL-3-abhängige murine myeloische Zelllinie 32Dcl3, die humanen myeloischen Zelllinien KCl22 und Kasumi-1, sowie die Affennieren Zelllinie Cos7 wurden nach im Stand der Technik bekannten Verfahren kultiviert. 32Dcl3 Zellen und KCl22 Zellen wurden durch Elektroporation mit 15 µg Plasmid DNA transfiziert und Cos-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin (Invitrogen) mit 5 µg Plasmid DNA transfiziert.

3. Immunoblotting:

Aus den mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M oder GFP-ΔM&M transfizierten Cos-Zellen wurden Proteinlysate hergestellt. Die drei Proteine wurden unter Verwendung des monoklonalen murinen GFP-Antikörpers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) nachgewiesen, wobei der Nachweis durch eine Inkubation mit Radieschen-Peroxidase konjugiertem sekundärem IgG-Antikörper gegen Maus IgG erfolgte (Jackson ImmunoResearch).

4. Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay

Cos7-Zellen wurden mit einer Gesamtmenge von 5 µg der Expressionsvektoren für c-myb, AML1-ETO, GFP und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die Herstellung von Zellkernextrakten der transfizierten Cos7-Zellen, die Bindungsreaktion und die Oligonukleotide, welche die c-myb Konsensus-Bindungssequenz aufweisen, sind in Müller et al., 1999, Blood, Vol.94, S. 4255-62, beschrieben. Für die kompetitiven Experimente wurden 100 ng doppelsträngiger Oligonukleotide verwendet, die entweder die myb Konsensusstelle oder eine unspezifische Bindungsstelle aufwiesen.

5. Chromatin Immunopräzipitation:

KCL22 Zellen wurden mit FLAG AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert. 12 Stunden nach der Transfektion wurden durch Zugabe von 1% Formaldehyd für 10 Minuten die zellulären Proteine

an die DNA gebunden und anschließend die Reaktion durch die Zugabe von 0,125 M Glycin beendet. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml RIPA Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren, 200 μ M Natrium Orthovanadat und 50 μ M NaF lysiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Chromatin mit Hilfe von UV-Strahlen fragmentiert (9 Pulse von 5 Sekunden). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation abgetrennt und 50 μ l wurden als "input"-Kontrolle aufbewahrt. Der Rest des Lysates wurde in 40 μ l Protein A/G-Agarose mit 5 μ g Kaninchen- und Maus-IgG vorgereinigt. Der Rest jedes Lysates wurde in zwei Proben aufgeteilt und die Immunopräzipitation wurde entweder unter Verwendung von 3 μ g eines anti-FLAG oder Maus-IgG mit 40 μ l Protein A/G-Agarose über Nacht durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden achtfach in einem Puffer mit geringem Salzgehalt gewaschen (0,1% SDS, 150 μ M NaCl, 1% Triton X-100, 2 μ M EDTA, pH 8,0, 20 μ M Tris-HCl, pH 8,1). Anschließend wurden die Verbindungen zwischen der DNA und den Proteinen in den Immunkomplexen und der "input"-Kontrolle wieder gelöst und die DNA aus der Lösung Phenol/Chloroform extrahiert. Dann wurden in den Proben spezifische Promotor-Sequenzen für die c-kit Promotor Region und die p14^{ARF} Promotor Region mittels PCR detektiert.

Die PCR wurde mit einer Taq-Polymerase (Promega) auf einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt (95°C für 3 Min., 37 Cyclen bei 95°C für 1 Min., 60°C für 1 Min. und 72°C für 1 Min.). Die Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Primer für die p14^{ARF} Promoter Region:

p14^{ARF} for: 5'-AGT GGC TAC GTA AGA GTG ATC GC-3' (SEQ ID NO: 7)
p14^{ARF} rev: 5'-CTT ACA GAT CAG ACG TCA AGC CC -3' (SEQ ID NO: 8)

Primer für die c-kit Promoter Region:

c-kit for: 5'- ACT GTT GTT GCT TTC CGT TCA A-3'
(SEQ ID NO: 9)
c-kit rev: 5'- TTA AGC CCG ATT TCA CTG CC-3'
(SEQ ID NO: 10)

6. Luziferase-Nachweis:

Der Nachweis der Promotoraktivität erfolgte nach im Stand der Technik bekannten Verfahren (Müller et al., 2000, Mol.Cell.Biol., Vol.20, S. 3316-29). Dabei wird eine Gesamtmenge von 15,5 µg Plasmid mittels Elektrophorese transfiziert. Die Mischung bestand aus 5 µg eines myb-TK Luziferasekonstruktes, 0,5 µg PRL-null Plasmid (Promega, Madison, WI) zur internen Standardisierung und 5 µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP-AM&M und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen. Leervektor wurde zum Ausgleich der Gesamtmenge an transfizierter DNA mittransfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase unter Verwendung des "Dual Luciferase Assay Systems" der Firma Promega detektiert. Die Renilla- Luziferase Aktivität wurde zur internen Standardisierung der Transfektionseffizienz benutzt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

7. Klonales Wachstum in Methylzellulose:

32Dcl3 Zellen und Kasumi Zellen wurden transient mit einer Gesamtmenge von 15 µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP, GFP-M&M und GFPAM&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Um das klonale Wachstum zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen am Tag nach der Elektroporation über eine Gradienten-Zentrifugation separiert und in einer Konzentration von 1×10^5 lebenden Zellen pro 35 mm Platte in 1 ml eines Kultur-Mixes ausgesiedelt. Dieser Mix bestand aus "Isocove

modifiziertes Dulbecco Medium" (IMDM, Life Technologies, Grand Island, N.Y.), 1% Methylzellulose, 20% FCS, IL-3 (1ng/ml) und 0,6 mg/dl G418. Alle Versuche wurden dreifach angesetzt und die Kolonien am Tag 10 gezählt. Aus drei unabhängigen Experimenten (für die Kasumi Zellen zwei Experimente) wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

8. Apoptoseassay:

32Dcl3 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die GFP-positiven Zellen mittels Durchflußzytometrie aus den gesamten Zellen heraussortiert und weiter untersucht. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen innerhalb der GFP positiven Zellen wurde mittels eines TUNEL Assays (APO-BrdU Kit der Firma Pharmingen) bestimmt, wobei die Experimente nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurden. Die Ergebnisse von einem der drei unabhängigen Experimente mit ähnlichen Ergebnissen werden gezeigt.

Beispiel 1 Klonierung des GFP-M&M und Expression in Cos-Zellen

Ein Fusionsprotein aus dem "enhanced green fluorescent protein" (GFP, für Nachweiszwecke; kodiert von den Nukleotiden 91-813 der SEQ ID NO:11), der DNA-Bindungsdomäne des murinen c-myb (die Nukleotide 193-594 der SEQ ID NO:13 kodieren für die Aminosäurereste 65-198 des murinen c-myb; vgl. Sakura et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.86, S. 5758-61) und der AML1-Bindungsdomäne des humanen Myeloid elf like Faktors, MEF (die Nukleotide 251-618 der SEQ ID:12 kodieren für die Aminosäurereste 87-206 des humanen MEF; vgl. Mao S. et al., 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44)) wurde konstruiert.

Der Transkriptionsfaktor c-myb ist dafür bekannt, daß er für eine

normale Hämatopoese und das Überleben der hämatopoetischen Zellen essentiell ist (Mucenski et al., 1991, Cell, Vol.65, S.677-89). Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung des c-myb durch Antisense-Strategien oder c-myb Knock out Mäuse nicht in der Lage sind, eine normale Hämatopoese auszubilden (Ratajczak et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.11823-7).

Als zweiter Teil des chimären Proteins wurde die AML1 Bindungsdomäne des MEF (Myeloid like ELF factor) verwendet. Die Aminosäuren 87-206 des MEF binden stark an AML1 und AML1-ETO in vivo und in vitro (Mao S. et al., 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44). Alle drei Domänen wurden in Leserichtung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Dieses Konstrukt wurde als GFP-M&M bezeichnet (Figur 1b). Für Kontrollzwecke wurde eine Deletionsmutante, welche die ersten 53 Aminosäuren der DNA Bindungsdomäne des c-myb nicht aufweist, hergestellt. Die Deletionsmutante wurde als GFP-ΔM&M bezeichnet.

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde nach transienter Transfektion in Cos7-Zellen mittels Immunoblot-Nachweisverfahren unter Verwendung von Anti-GFP-Antikörper analysiert (GFP alleine 35 kDa, GFP-ΔM&M 80 kDa; GFP-M&M 85 kDa; Fig. 1c).

Beispiel 2 Analyse der Bindung von GFP-M&M an myb Bindungsstellen

Um die Interaktion des GFP-M&M mit myb DNA Bindungsstellen zu analysieren, wurden elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays durchgeführt (vgl. Figur 2). Dafür wurden nukleäre Extrakte transient transfizierter Cos7-Zellen hergestellt. Ein doppelsträngiges myb-Consensus Oligonucleotid diente als Ziel-DNA. Diese Experimente zeigten, daß GFP-M&M ähnlich wie c-myb spezifisch an myb DNA-Bindungsstellen bindet. AML1-ETO alleine wies keine Bindung an die myb-Bindungsstellen auf, aber GFP-M&M führte zu einer Bindung von AML1-ETO an die DNA. Dies resultierte in einem Supershift des Komplexes bestehend aus DNA, GFP-M&M und AML1-ETO

(Fig.2).

Beispiel 3 GFP-M&M bindet AML1-ETO an den endogenen c-Kit Promotor

Die Bindung des GFP-M&M und die Bindung von AML1-ETO an endogene c-myb Ziel-Promotoren wurde unter Verwendung eines Chromatin Immunpräzipitations-Nachweisverfahrens (ChIP) in KCL22 Zellen analysiert.

Als c-myb abhängiger endogener Promotor wurde der c-kit Promotor gewählt. Als Positivkontrolle wurde die nachgewiesene Bindung von AML1-ETO an den p14^{ARF} Promotor analysiert (Linggi et al., Nature Medicine, 8 (7), Juli 2002)). Eine mit FLAG markierte Form des AML1-ETO wurde in Kombination mit GFP oder GFP-M&M in KCL22 Zellen exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren wurden mit DNA unter Verwendung von Formaldehyd vernetzt. Nach Zell-Lyse und DNA Fragmentierung wurden DNA/AML1-ETO Komplexe unter Verwendung eines anti-FLAG-Antikörpers oder für Kontrollzwecke unspezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Die Vernetzung wurde aufgehoben und die Gegenwart der c-kit- und p14^{ARF}-Promotor DNA Sequenz wurde mittels PCR analysiert. Die Sequenz des c-kit Promotors war in den ChIP-Proben der KCL22 Zellen, die mit AML1-ETO und GFP transfiziert worden waren, nicht nachweisbar.

In Gegenwart des GFP-M&M wurden jedoch die c-kit Promotor-Sequenzen mit AML1-ETO immunpräzipitiert (Fig.3). Im Gegensatz dazu wurde die p14^{ARF} Promotorsequenz in Immunkomplexen aus KCL22 Zellen nachgewiesen, die mit AML1-ETO und GFP transfiziert worden waren. Die Sequenz wurde nicht in Gegenwart von AML1-ETO und GFP-M&M nachgewiesen (Fig.3).

Diese Ergebnisse zeigen, daß GFP-M&M AML1-ETO an den endogenen c-myb abhängigen Promotor c-kit in vivo binden kann.

Beispiel 4 Hemmung von myb abhängigen Promotoren in Gegenwart von
GFP-M&M und AML1-ETO

GFP-M&M bindet an myb abhängige Promotoren, bildet mit AML1-ETO (soweit vorhanden) einen Komplex und inhibiert dadurch die Genexpression.

Als weiterer Nachweis wurden Luziferase-Assays durchgeführt, wobei das Luziferase-Gen unter der Kontrolle eines minimalen Thymidin-Kinase-Promotors mit drei zusätzlichen myb DNA-Bindungsstellen stand (Ziebold et al., 1997, Curr.Biol., Vol.7, S. 253-60). KCL22 Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten und GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert (Fig.4). Keines der Proteine war alleine in der Lage, die Luziferase-Aktivität wesentlich zu beeinflussen. Zellen, die GFP-M&M und AML1-ETO zusammen exprimieren, zeigten jedoch eine mehr als 5-fache Hemmung der Promotor-Aktivität (Fig.4). Anschließend wurde analysiert, ob die funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA Bindungsstellen für die Hemmung der Luziferase-Aktivität mittels GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen notwendig war. Die Mutation der DNA Bindungsstelle in GFP-AM&M hemmt die DNA Bindung des rekombinanten Proteins, wobei jedoch die Expression des Proteins nicht verändert wird (Figur 1b). Weder die Expression von GFP-AM&M alleine, noch die Expression von GFP-AM&M und AML1-ETO zusammen hemmten die Luziferase-Aktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die GFP-M&M Bindung an die DNA für die Repression des myb abhängigen Gens in Gegenwart von AML1-ETO notwendig ist (Fig.4).

Beispiel 5 Hemmung des Koloniewachstums durch GFP-M&M in AML1-ETO
exprimierenden Zellen

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Myb und die Expression der myb abhängigen Gene sind für das Wachstum und die Proliferation

hämatoopoetischer Zellen essentiell (White et al., 2000, Oncogene, Vol.19, S.1196-205). Daher wurde die Wirkung von GFP-M&M auf die Proliferation und Überlebensrate der AML1-ETO enthaltenden Zellen analysiert.

Zunächst wurde die Fähigkeit der transfizierten hämatoopoetischen 32D Zellen zur Kolonienbildung untersucht. Das Koloniewachstum wurde in Zellen, die mit AML1, GFP-M&M oder AML1 und GFP-M&M transfiziert worden waren, nicht gehemmt.

Zellen, die mit AML1-ETO alleine transfiziert worden waren, zeigten eine sechsfache Hemmung des Kolonienwachstums, welche wahrscheinlich auf den toxischen Effekt des AML1-ETO selbst zurückzuführen ist (Muller et al., Mol.Cell.Bio., 2000, Vol.20., S.3316-29). Transfektion der 32D Zellen mit GFP-M&M in Gegenwart von AML1-ETO reduzierte jedoch das Wachstum der Kolonien etwa um das 60fache (Figur 5a und b). Im Vergleich zu GFP-M&M und GFP-AM&M in Kolonie-Assays wurde festgestellt, daß eine gemeinsame Expression von GFP-M&M und AML1-ETO die relative Anzahl der Kolonien um mehr als 80% reduzierte. Im Gegensatz dazu inhibierten GFP-AM&M und AML1-ETO nicht das Kolonienwachstum (Fig.5c). Die letztere Beobachtung zeigt, daß eine funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA-Bindungsstellen für die Hemmung des Kolonienwachstums in AML1-ETO positiven Zellen notwendig ist.

Neben den Wirkungen von GFP-M&M in AML1-ETO transfizierten Zellen wurde auch die Aktivität von GFP-M&M in t(8;21) positiven Kasumi-1 Leukämiezellen untersucht. Das Koloniewachstum wurde nach Transfektion mittels GFP-M&M im Vergleich zu Zellen, die mit GFP-pcDNA3.1 alleine (Kontrolle) transfiziert worden waren, um das 12fache reduziert (Fig.5d).

Beispiel 6

Induktion der Apoptose durch GFP-M&M in AML1-ETO
enthaltenden Zellen

Hämatopoetische Zellen, die keine c-myb Aktivität aufweisen, unterliegen der Apoptose (Taylor et al., 1996, Genes Dev., Vol.10, S.2732-44).

Um die Wirkung von GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen und deren Einfluß auf die Apoptose zu untersuchen, wurde die Gegenwart von DNA Strangbrüchen mittels TUNEL-Assay untersucht. 32D-Zellen wurden mit GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M oder mit einer Kombination aus AML1-ETO und GFP-M&M transfiziert. Nach 24 Stunden befanden sich etwa 10% der Zellen, die GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M allein exprimieren, in Apoptose. Im Gegensatz dazu betrug der Prozentsatz apoptotischer Zellen unter den Zellen, die sowohl AML1-ETO als auch GFP-M&M exprimierten, 39%. Dies entspricht einer vierfachen Zunahme der Apoptoserate (Fig. 6a und b).

Patentansprüche

1. Verbindung, die Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
2. Verbindung gemäß Anspruch 1, die ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, oder ein organisches Molekül mit einem Molekulargewicht von < 5000 , < 1000 oder < 500 ist.
3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in der das Tumor-spezifische Molekül ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA ist.
4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, die eine Bindungsaffinität in 10^{-5} - 10^{-12} , und besonders bevorzugt von 10^{-7} bis 10^{-9} aufweist.
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in der das Tumor-spezifische Molekül in gesunden Zellen nicht oder in anderer Form vorliegt.
6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, in der das Tumor-spezifische Molekül ein Fusionsprotein ist.
7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, in der das Tumor-spezifische Molekül AML1-ETO ist.
8. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, in der das Tumor-spezifische Molekül eine DNA-Bindungsdomäne, ein Signalpeptid, Kinaseaktivität, Chromatinmodulatorische Eigenschaften, Protein-Proteininteraktionsdomänen oder Transkriptionelle Eigenschaften aufweist.

9. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, in der die Dyslokalisierung das Wachstum Tumor-spezifischer Zellen inhibiert.
10. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der die Dyslokalisierung in Tumor-spezifischen Zellen Apoptose induziert.
11. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, in der die Dyslokalisierung das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert.
12. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, in der die Dyslokalisierung das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert, wodurch die Transkription des Gens aktiviert oder inhibiert wird.
13. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myc DNA-Bindungsdomäne umfaßt.
14. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, in der die Verbindung die Peptidsequenz der AML-1-Bindungs-domäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
15. Verbindung gemäß Anspruch 13 oder 14, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myc DNA-Bindungsdomäne und die Peptidsequenz der AML-1-Bindungsdomäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
16. Verbindung gemäß Anspruch 15, in der die Verbindung die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Sequenz aufweist.

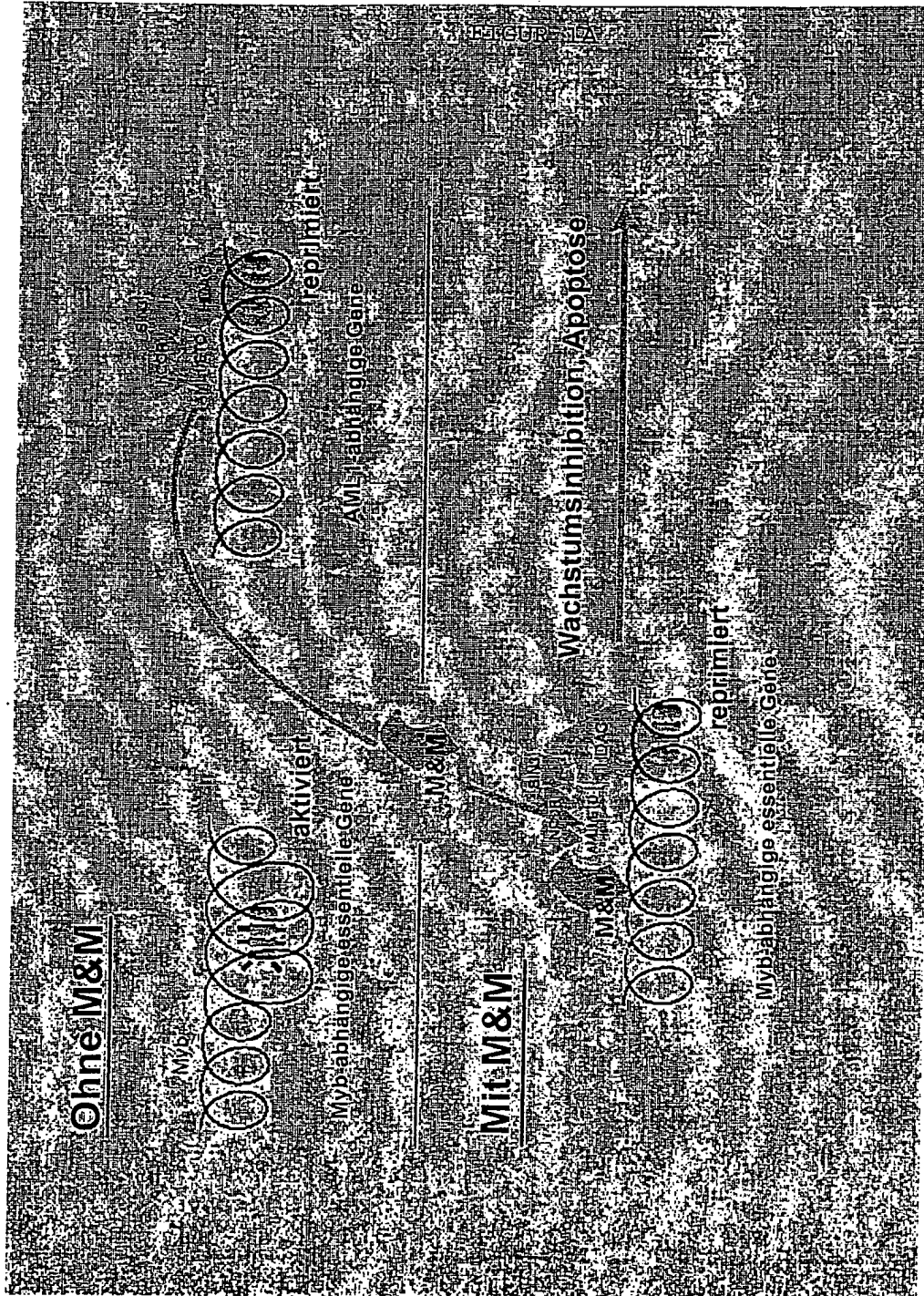
17. Nukleinsäure, die für ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 2 bis 16 kodiert.
18. Nukleinsäure gemäß Anspruch 17, die eine DNA oder RNA ist.
19. Vektor, der eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 umfaßt.
20. Wirtszelle, die eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 oder einen Vektor gemäß Anspruch 19 aufweist.
21. Arzneimittel, das eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, einen Vektor gemäß Anspruch 19 oder eine Wirtszelle gemäß Anspruch 20 umfaßt.
22. Arzneimittel gemäß Anspruch 21, das ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.
23. Arzneimittel gemäß Anspruch 21 oder 22, das zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert ist.
24. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, eines Vektors gemäß Anspruch 19 oder einer Wirtszelle gemäß Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren.
25. Verwendung gemäß Anspruch 24, wobei der Tumor Leukämie, insbesondere Akute Myeloische Leukämie ist.
26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, bei dem man das Peptid oder Protein rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewinnt.

27. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei dem man:
- (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert;
 - (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, bei dem man das Tumor-spezifische Molekül mittels Micoarray-Analysen, 2D-Proteingelelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung oder einer Kombination der genannten Verfahren identifiziert.
29. Verfahren gemäß Anspruch 27 oder 28, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, ein Protein, eine RNA eine DNA oder eine organische Verbindung ist.
30. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem man die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, mittels Hochdurchsatz-Screening-Verfahren identifiziert.
31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, aus zwei Teilen zusammengesetzt wurde.

32. Verfahren gemäß Anspruch 31, bei dem ein Teil der Verbindung eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und der zweite Teil die Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
33. Verfahren gemäß Anspruch 31 oder 32, bei dem die zwei Teile in getrennten Screening-Verfahren identifiziert werden.
34. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, Schritte umfassend, bei denen man:
 - (a) eine Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, mittels eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 27 bis 33 identifiziert;
 - (b) die Verbindung synthetisch oder rekombinant herstellt; und
 - (c) die Verbindung zu einem Arzneimittel formuliert.
35. Verfahren gemäß Anspruch 34, bei dem das Arzneimittel zur Behandlung von Tumoren, beispielsweise zur Behandlung von Leukämie und insbesondere zur Behandlung Akuter Myeloischer Leukämie geeignet ist.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dyslokalisationsmoleküle, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Tumoren.



2/12

FIGUR 1B

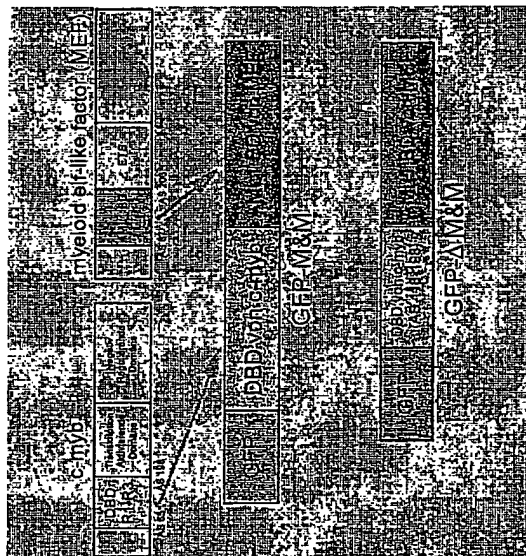
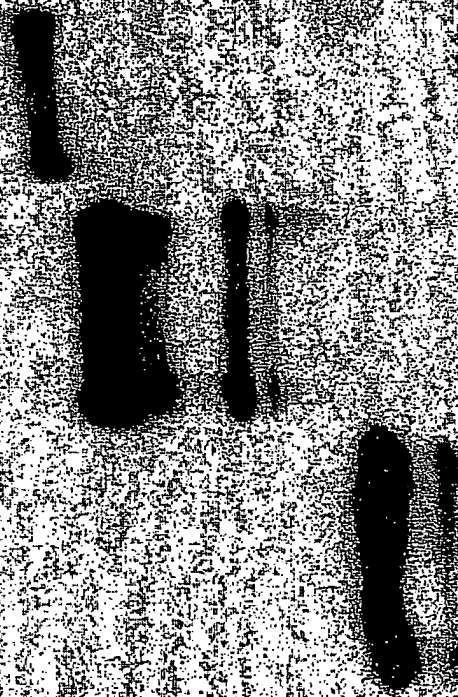


FIGURE 1C

86 kD -

32 kD -

GFP-M&M
GFP-M&M
GFP-M&M

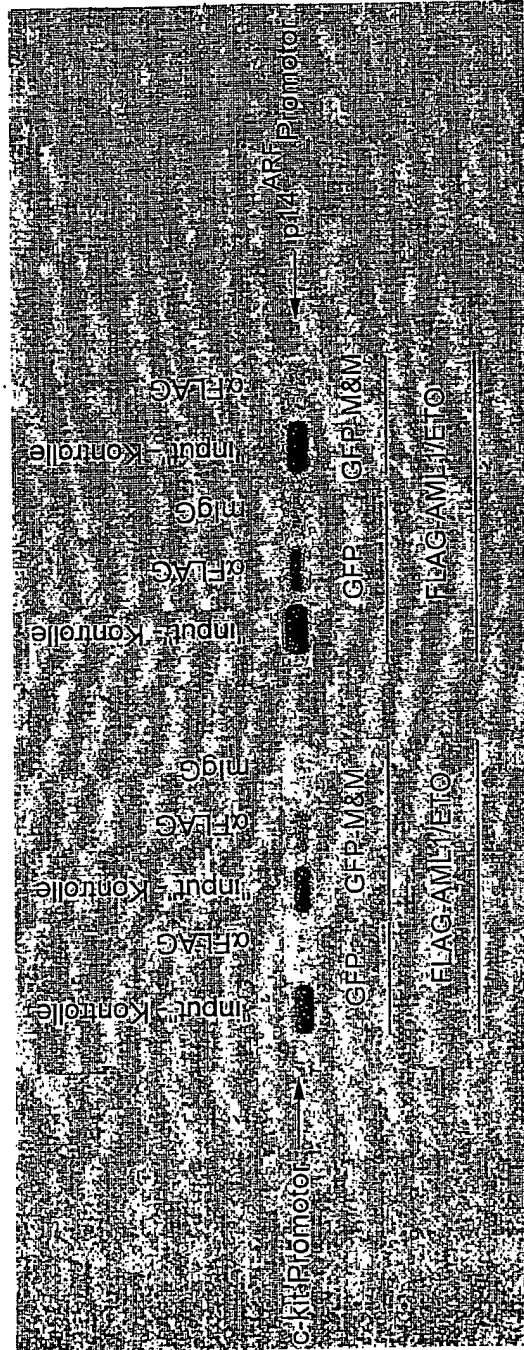


4/12

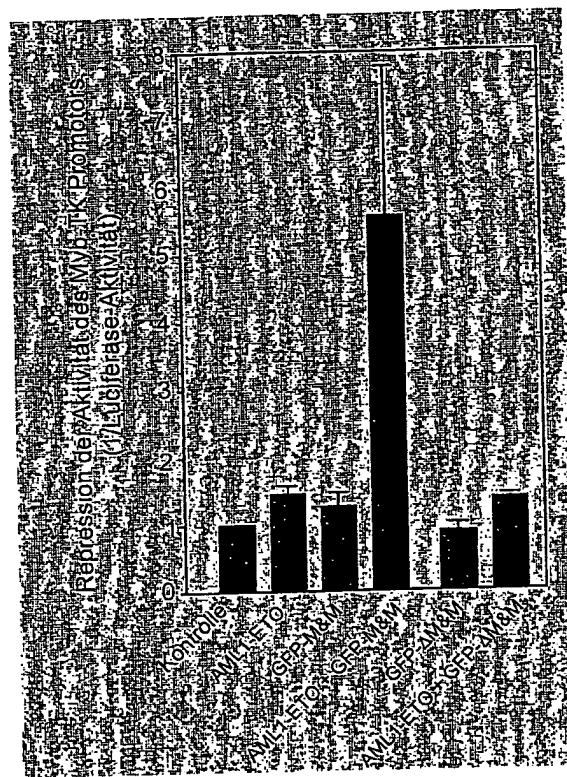
FIGUR 2



FIGUR 3

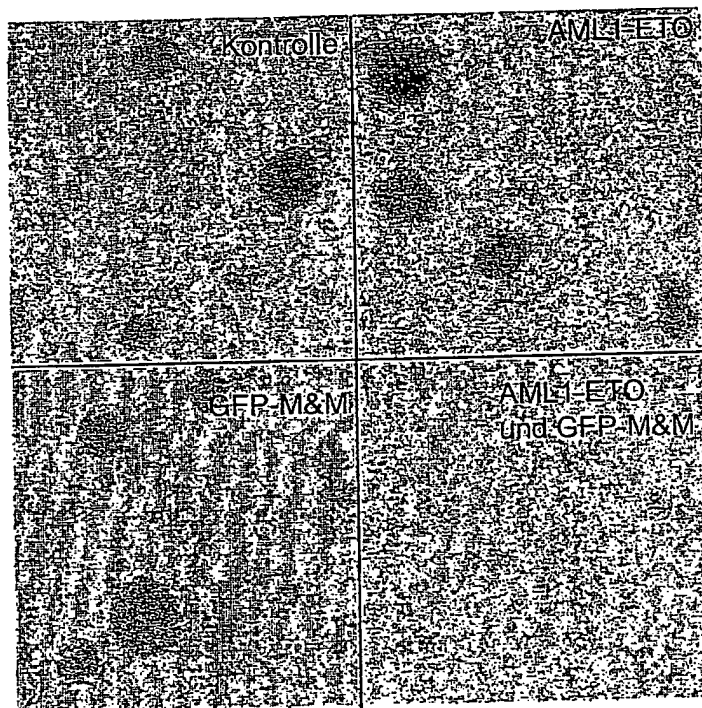


FIGUR 4



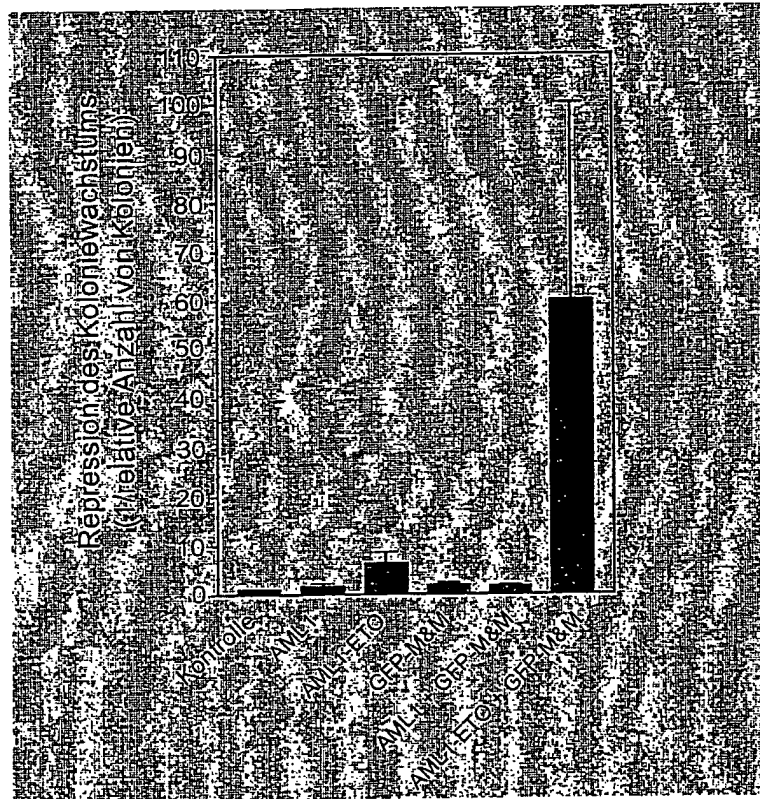
7/12

FIGUR 5A



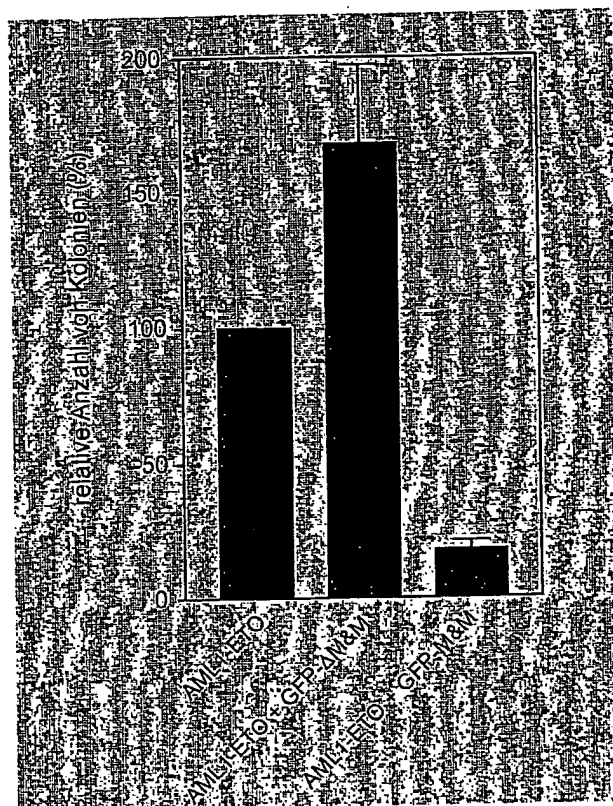
8/12

FIGUR 5B



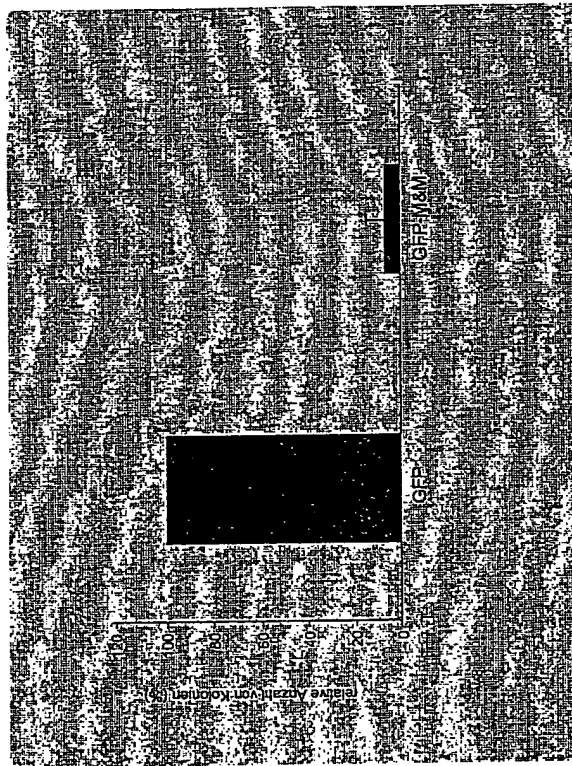
9/12

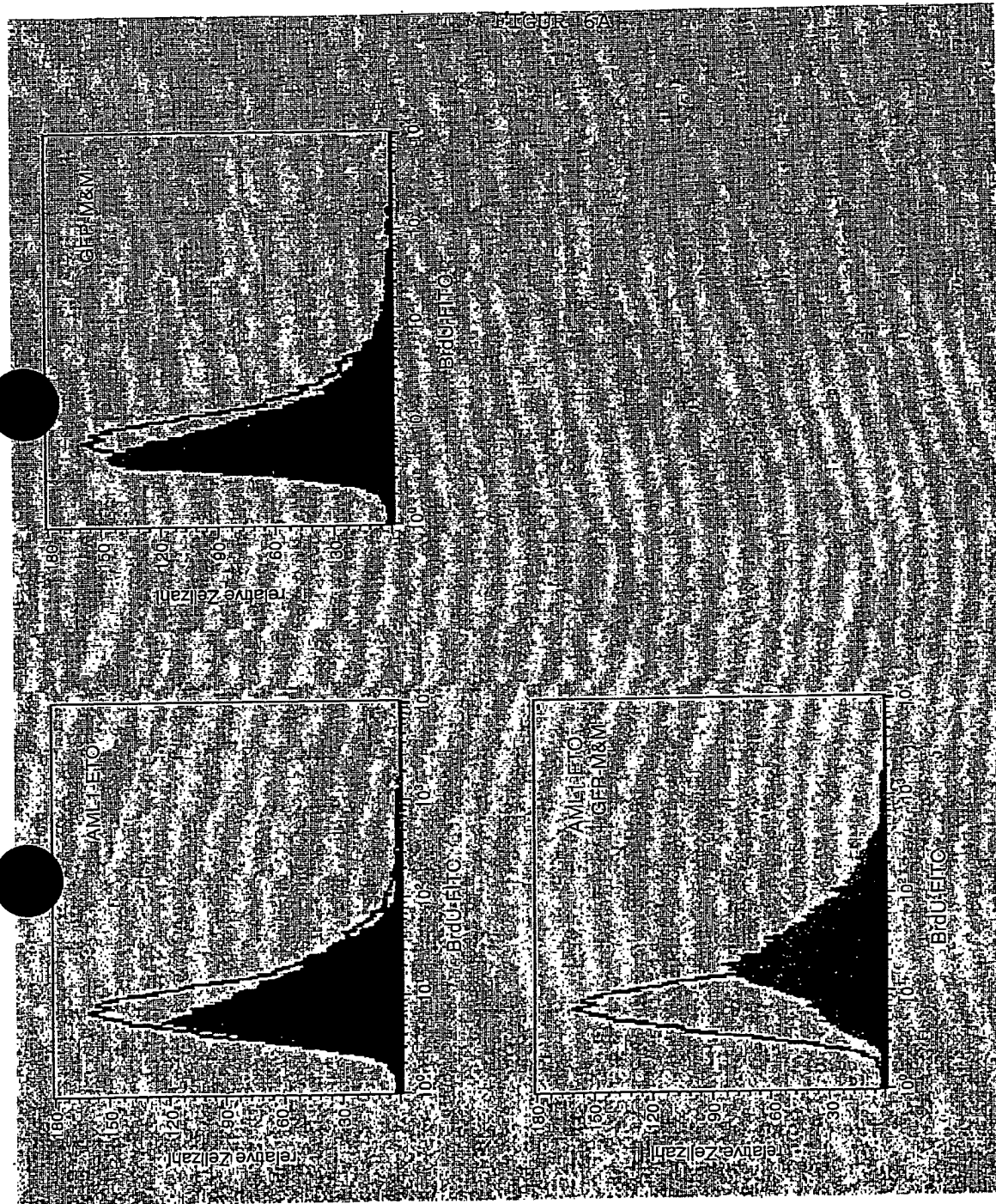
FIGUR 5C



10/12

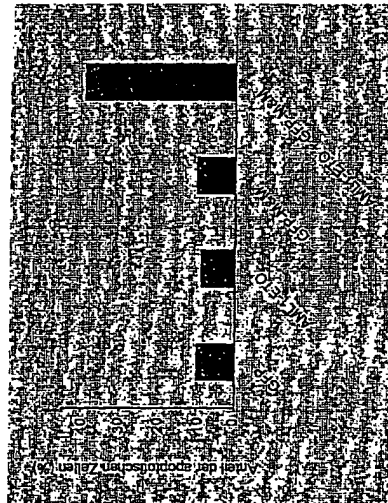
FIGUR 5D





12/12

FIGUR 6B



Sequenzprotokoll

<110> E. Berdel, C. Müller-Tidow, H. Serve, B. Steffen

<120> Dyslokationsmoleküle und deren Verwendung

<130> P057744

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 497

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<223> Aminosäuresequenz von GFP-M&M

<400> 1

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly
225 230 235 240

Thr Val Ile Ala Asn Tyr Leu Pro Asn Arg Thr Asp Val Gln Cys Gln
245 250 255

His Arg Trp Gln Lys Val Leu Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gly Pro Trp
260 265 270

Thr Lys Glu Glu Asp Gln Arg Val Ile Glu Leu Val Gln Lys Tyr Gly
275 280 285

Pro Lys Arg Trp Ser Val Ile Ala Lys His Leu Lys Gly Arg Ile Gly
290 295 300

Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn His Leu Asn Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Lys Thr Ser Trp Thr Glu Glu Glu Asp Arg Ile Ile Tyr Gln Ala His
325 330 335

Lys Arg Leu Gly Asn Arg Trp Ala Glu Ile Ala Lys Leu Leu Pro Gly
340 345 350

Arg Thr Asp Asn Ala Ile Lys Asn His Trp Asn Ser Thr Met Arg Arg
355 360 365

Lys Val Glu Gln Glu Gly Tyr Gly Ser Ala Thr Ser His Thr Met Ser
370 375 380

Thr Ala Glu Val Leu Leu Asn Met Glu Ser Pro Ser Asp Ile Leu Asp
385 390 395 400

Glu Lys Gln Ile Phe Ser Thr Ser Glu Met Leu Pro Asp Ser Asp Pro
405 410 415

Ala Pro Ala Val Thr Leu Pro Asn Tyr Leu Phe Pro Ala Ser Glu Pro
420 425 430

Asp Ala Leu Asn Arg Ala Gly Asp Thr Ser Asp Gln Glu Gly His Ser
435 440 445

Leu Glu Glu Lys Ala Ser Arg Glu Glu Ser Ala Lys Lys Thr Gly Lys
450 455 460

Ser Lys Lys Arg Ile Arg Lys Thr Lys Gly Asn Arg Ser Thr Ser Pro
465 470 475 480

Val Thr Asp Pro Ser Ile Pro Ile Arg Lys Lys Ser Lys Asp Gly Lys
485 490 495

Gly

<210> 2

<211> 1491

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> Nukleotidsequenz von GFP-M&M

<400> 2

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gtccagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccggtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca ccagtcctgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgaga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagggc	720
accgtcattg ccaattatct gccaaccgg acagatgtgc agtgccaaca ccggtggcag	780
aaagtgtga accctgaact catcaaaggt ccttgagca aagaagaaga tcagagagtc	840
atagagcttg tccagaaata tggccgaag cgttggctctg ttattgcaaa gcacttaaaa	900

```

gggagaattg gaaagcagtg tcgggagagg tggcacaacc atttgaatcc agaagttaag      960
aaaacctcct ggacagaaga ggaggacaga atcatttacc aggcacacaa gcgtctgggg      1020
aacagatggg cagagatcgc aaagctgctg cccggacgga ctgataatgc tatcaagaac      1080
cactggaatt ccaccatgcg tcgcaagggtg gaacaggaag gctacggatc cgccacctcg      1140
cacaccatgt caaccgcgga agtcttactic aatatggagt ctccacagcga tctcctggat      1200
gagaagcaga tcttcagtag ctccgaaatg cttccagact cggaccctgc accagctgtc      1260
actctgocca actacctgtt tcttgctctt gagcccgatg ccctgaacag ggccgggtgac      1320
actagtgacc aggaggggca ttctctggag gagaaggcct ccagagagga aagtgccaaag      1380
aagactggga aatcaaagaa gagaatccgg aagaccaagg gcaaccgaag tacctcacct      1440
gtcactgacc ccagcatccc cattaggaag aaatcaaagg atggcaaagg c                1491

```

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer MEF-BamHI for

<400> 3
 ataggatccg ccacctcgca caccatgtca 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer MEF-EcoRI rev

<400> 4
 cagaattcgc ctttgccatc ctttgatttc 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer myb-KpnI for

<400> 5
 cagagaggta ccgtcattgc caattatctg 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer myb-BamHI rev

<400> 6

cagagaggat ccgtagcctt cctgttcac

30

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer p14^{AMP} for

<400> 7

agtggctacg taagagtgat cgc

23

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer p14^{AMP} rev

<400> 8

cttacagatc agacgtcaag ccc

23

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer c-kit for

<400> 9

actggtgttg ctttcggtc aa

22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> Oligonukleotidprimer c-kit rev

<400> 10

ttaagcccga tttcactgcc

20

<210> 11

<211> 4151

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<223> cDNA EGFP

<400> 11

tagttattac tagcgctacc ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctgcagtcg

60

acgggtaccgc gggcccgga tccaccggtc gccaccatgg tgagcaaggg cgaggagctg

120

ttcaccgggg tggtgcccac cctggtcgag ctggacggcg acgtaaaccg ccacaagttc

180

agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc	240
tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc	300
gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtcggcc	360
atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag	420
acccgcggcg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc	480
atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc	540
cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc	600
cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgcgacc actaccagca gaacaccccc	660
atcgcgacg gccccgtgct gctgcccgc aaccactacc tgagcaccca gtccgcccgt	720
agcaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgcggcc	780
gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaaagcg gccgcgactc tagatcataa	840
tcagccatac cacatttcta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctcccc	900
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttggttaa cttgtttatt gcagcttata	960
atggttacaa ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc	1020
attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta aggcgtaaat tgtaagcgtt	1080
aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gtcattttt taaccaatag	1140
gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt	1200
gttcagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga	1260
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacat caccctaact aagttttttg	1320
gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct	1380
tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc	1440
gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt	1500
aatgcgccgc tacagggcgc gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaacccct	1560
atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga	1620
taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtcctgagg cggaaagaac cagctgtgga	1680
atgtgtgtca gttaggggtg ggaaagtcac caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa	1740
gcatgcatct caattagtca gcaaccaggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca	1800
gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaacat agtcccgccc ctaactccgc	1860
ccatccccgc cctaactccg cccagttccg cccattctcc gcccctggc tgactaattt	1920
tttttattta tgcagaggcc gagggcgctt cggcctctga gctattccag aagtagtgag	1980
gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca aagatcgatc aagagacagg atgaggatcg	2040

tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 2100
ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 2160
ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 2220
gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca 2280
gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 2340
gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat 2400
gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 2460
catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg 2520
gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg 2580
cccgaaggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatgggtg 2640
gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 2700
caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 2760
cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc 2820
cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc 2880
ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg 2940
gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt 3000
tcttcgcca ccctaggggg aggctaactg aaacacggaa ggagacaata ccggaaggaa 3060
cccgcgctat gacggcaata aaaagacaga ataaaacgca cgggtgttggg tcgtttgttc 3120
ataaacgcgg ggttcggtcc cagggtggc actctgtcga taccaccgc agacccatt 3180
ggggccaata cgcgcgctt tcttcctttt cccaccacca cccccaagt tcgggtgaag 3240
gccagggtc cgcagccaac gtccggggcg caggccctgc catagcctca ggttactcat 3300
atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc 3360
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 3420
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct 3480
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 3540
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 3600
tagtgtagcc gtagttaggc caccatttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 3660
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt 3720
tggaactcaag acgatagtta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 3780
gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 3840
tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatatccg gtaagcggca 3900

gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 3960
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4020
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 4080
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat aaccgtatta 4140
ccgccatgca t 4151

<210> 12
<211> 1992
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<223> cDNA MEF

<400> 12
atggctatta ccctacagcc cagtgcctg atctttgagt tcgcaagcaa cgggatggat 60
gatgataacc accagctgga agaccctct gtgttccag ctgtgatcgt ggagcaggta 120
ccctaccctg atttactgca tctgtactcg ggactggagt tggacgacgt tcacaatggc 180
atcataacag acgggacctt gtgcatgacc caggatcaga tcctggaagg cagttttttg 240
ctgacagatg acaatgaggc cacctcgac accatgtcaa ccgcggaagt cttactcaat 300
atggagtctc ccagcgatat cctggatgag aagcagatct tcagtacctc cgaaatgctt 360
ccagactcgg accctgcacc agctgtcact ctgcccaact acctgtttcc tgcctctgag 420
cccgatgccc tgaacagggc gggtgacact agtgaccagg aggggcattc tctggaggag 480
aaggcctcca gagaggaaag tgccaagaag actgggaaat caaagaagag aatccggaag 540
accaagggca accgaagtac ctcacctgtc actgacccca gcatcccat taggaagaaa 600
tcaaaggatg gcaaaggcag caccatctat ctgtgggagt tcctcctggc tcttctgcaa 660
gacagaaaca cctgtcccaa gtacatcaag tggaccacgc gagagaaagg catcttcaaa 720
ctgggtggact ccaaagctgt gtccaagctg tgggggaagc agaaaaaaa gcctgacatg 780
aactatgaga caatggggcg ggcactaaga tactactacc aaagaggcat actggccaaa 840
gtggaagggc agaggctggt gtaccagttt aaggagatgc ccaaggacct ggtggtcatt 900
gaagatgagg atgagagcag cgaagccaca gcagccccac ctcaggcctc cacggcctct 960
gtggcctctg ccagtaccac cgggcgaacc agctccaggg tctcatccag atctgcccc 1020
cagggaagg gcagctcttc ttgggagaag ccaaaaattc agcatgtcgg tctccagcca 1080
tctgcgagtc tggaattggg accgtcgcta gacgaggaga tccccactac ctccaccatg 1140
ctcgtctctc cagcagaggg ccaggtcaag ctcaccaaag ctgtgagtgc atcttcagt 1200
cccagcaaca tccacctagg agtggcccc gtggggtcgg gctcgccct gaccctgcag 1260
acgatccac tgaccacggt gctgaccaat gggcctcctg ccagtactac tgctccact 1320

cagctcgttc tccagagtgt tccagcggcc tctactttca aggacacctt cactttgcag 1380
 gcctctttcc cctgaacgc cagtttccaa gacagccagg tggcagcccc aggggtcca 1440
 ctgattctca gtggcctccc ccaacttctg gctggggcca accgtccgac caaccggcg 1500
 ccacccacgg tcacaggggc tggaccagca gggcccagct ctacgcccc tgggactgtc 1560
 attgtgcct tcacaggac ttctggcact acagcagccc ctagggtcaa ggaggggcca 1620
 ctgaggctct cctcctatgt tcagggtatg gtgacggggg ccccatgga ggggtgctg 1680
 gttcctgaag agaccctgag ggagctcctg agagatcagg ctcatcttca gccacttcca 1740
 acccaggtgg tttccagggg ttcccacaat ccgagccttc tgggcaacca gactttgtct 1800
 cctcccagcc gcccactgt tgggtgacc ccagtggctg aacttgagct ctctcaggg 1860
 tcagggtccc tgctgatggc tgagcctagt gtgaccacat ctgggagcct tctgacaaga 1920
 tccccaccc cagccccctt cccccattc aacctactt cctcattaa gatggagccc 1980
 catgacatat aa 1992

<210> 13
 <211> 1913
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <223> cDNA c-myb

<400> 13
 atggcccga gaccccgaca cagcatctac agtagcgatg aagatgatga agacattgag 60
 atgtgtgacc atgactacga tgggtgctg cccaaatctg gaaagcgtca cttggggaaa 120
 actaggtgga caagggaaga ggaatgagaag ctgaagaagc tgggtgaaca gaacggaaca 180
 gacgactgga aagtcattgc caattatctg cccaaccgga cagatgtgca gtgccaacac 240
 cgggtggcaga aagtgttgaa cctgaactc atcaaaggtc cctggaccaa agaagaagat 300
 cagagagtca tagagcttgt ccagaaatat ggtccgaagc gttggtctgt tattgccaag 360
 cacttaaaag ggagaattgg aaagcagtggt cgggagaggt ggcacaacca tttgaatcca 420
 gaagttaaga aaacctcctg gacagaagag gaggacagaa tcatttacca ggcacacaag 480
 cgtctgggga acagatgggc agagatcgca aagctgctgc ccggacggac tgataatgct 540
 atcaagaacc actggaattc caccatgcgt cgcaagggtg aacaggaagg ctacctgcag 600
 aagccttcca aagccagcca gacgccagtg gccacgagct tccagaagaa caatcatttg 660
 atgggggttg ggcatgcctc acctccatct cagctctctc caagtggcca gtctccgtc 720
 aacagegaat atccctatta ccacatgcc gaagcacaaa acatctccag tcacgttccc 780
 tatctgtcg cattgcatgt taatatagtc aacgtccctc agccggtgc ggcagccatc 840
 cagagacact ataacgacga agaccctgag aaggaaaagc gaataaagga gctggagttg 900

ctcctgatgt caacagagaa cgagctgaag ggacagcagg cattaccaac acagaaccac	960
acttgcagct accccgggtg gcacagcacc tccattgtgg accagaccag acctcatggg	1020
gatagtgcac ctgtttcctg tttgggagaa caccatgcc a ccccatctct gcctgcagat	1080
cccggctccc tacctgaaga aagtgcctca ccagcaagg gcatgatcgt ccaccagggc	1140
accattcttg acaatgttaa gaacctctta gaatttgcag aaacactcca gtttatagat	1200
tctttcttga acacttcag caaccatgaa aactcgggt tagatgcacc taccttacc	1260
tccactctc tcattggtca caaactgaca ccatgtcgag accagactgt gaaaaccag	1320
aaggaaaatt ccatctttag aactccagct atcaaaagg caatcctcga aagctctcct	1380
cgaaactcca caccattcaa acatgccctt gcagctcaag aaattaaata cggctcccctg	1440
aagatgctac ctcagacccc ctcccatgca gtggaggacc tacaagatgt gattaagcgg	1500
gaatcggatg aatctggaat tggtgtgag tttcaagaga gtggaccacc gttactgaaa	1560
aaaatcaagc aggcgggtgga gtcgccaact gagaaatcgg gaaacttctt ctgctcaaac	1620
cactgggcag agaacagcct gagcacccaa ctgttctcgc aggcgtctcc tgtggcagat	1680
gccccaaata ttcttacaag ctctgtttta atgacacctg tatcagaaga tgaagacaat	1740
gtcctcaaag cctttaccgt acctaagaac aggcccttg tgggtccctt gcagccatgc	1800
agtgggtgct gggagccagc atcctgtggg aagacagagg accagatgac ggcctccggt	1860
cgggtcggga aatacgtgaa cgcgttctca gctcgaactc tggatcatgtg aga	1913